

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-259198
 (43)Date of publication of application : 29.09.1998

(51)Int.Cl. C07K 14/415
 A61K 38/00
 A61K 39/36
 // C12N 15/09
 C12P 21/02
 (C12P 21/02
 C12R 1:19)
 (C12P 21/02
 C12R 1:125)
 (C12P 21/02
 C12R 1:865)
 (C12P 21/02
 C12R 1:91)

(21)Application number : 09-353448

(71)Applicant : SANKYO CO LTD
 HAYASHIBARA BIOCHEM LAB INC

(22)Date of filing : 22.12.1997

(72)Inventor : SAITO SABURO
 HIRAHARA KAZUKI
 KAWAGUCHI JUNKO
 SHIRAISHI AKIO
 SERIZAWA NOBUKI
 TANIGUCHI YOSHIFUMI

(30)Priority

Priority number : 08343441 Priority date : 24.12.1996 Priority country : JP

(54) CONNECTED T-CELL EPITOPE AND ITS USE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new peptide that comprises a peptide including a specific amino acid sequence having T-cell epitope, deactivates human T-cell that specifically reacts with the cedar pollen allergen and is useful as an active ingredient for anti-cedar pollinosis.

SOLUTION: This new peptide contains the amino acid sequence of the formula ($\alpha_1-\alpha_n$ have different sequences comprising 11-19 amino acids and represents the amino acid sequence constituting T-cell epitope originating from human cedar allergen protein Cryj1 or Crtj2; $\beta_1-\beta_{n-1}$ represent an arbitrary sequence of 0-3 amino acids; m is an integer of ≥ 2), its conjugated product, their derivatives or their polymer. When these peptides are given to general mammals including human, the T-cell specific to the cedar pollen allergen is deactivated with no induction of anaphylaxis and is useful as an anti-cedar pollinosis. This peptide is prepared by solid phase synthesis according to the amino acid sequence of the cedar pollen allergen.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 20.11.2002
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-259198

(43)公開日 平成10年(1998)9月29日

(51)Int.Cl ⁶	識別記号	P 1
C 07 K 14/415	Z NA	C 07 K 14/415
A 61 K 38/00	ABF	A 61 K 39/36
39/38		C 12 P 21/02
// C 12 N 15/09		A 61 K 37/02
C 12 P 21/02		C 12 N 15/00
審査請求 未請求 請求項の数13 OL (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願平9-353448	(71)出願人	000001856 三共株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
(22)出願日	平成9年(1997)12月22日	(71)出願人	000158908 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(31)優先権主張番号	特願平8-343441	(72)発明者	齊藤 三郎 東京都品川区西五反田2丁目30番10-1101 号
(32)優先日	平8(1996)12月24日	(72)発明者	平原 一樹 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遷殖したT細胞エピトープとその用途

(57)【要約】 (修正有)

【解決手段】 式 I :

$$\alpha_1 - \beta_1, -\alpha_2 - \beta_2, -\alpha_3 - \beta_3, \dots -\beta_n, -\alpha_n \quad (!)$$

(式 I 中、 $\alpha_1 \sim \alpha_n$ は 11 ~ 19 個のアミノ酸からなるそれぞれ異なるアミノ酸配列であって、かつヒトにおいてスキアレルゲンタンパク質 C_r y_j 又は C_r y_j 2 由来の T 細胞エピトープを構成するアミノ酸配列。 $\beta_1 \sim \beta_n$ は 1 ~ 3 個のアミノ酸からなる任意の同一の又は異なるアミノ酸配列。n は 2 以上の整数。) で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体、若しくはその複合体又は前記ペプチド、その複合体、その誘導体、若しくはその複合体を有効成分として含む抗スキ花粉症剤。

【効果】 これらのペプチドは、ヒトを含む哺乳類一般に投与すると、実質的にアナフィラキシーを引き起こすことなく、スキ花粉アレルゲンに特異的な T 細胞を不活性化することができる。

(2)

特開平10-259198

1

2

【特許請求の範囲】

 $\alpha_1 - \beta_1 - \alpha_2 - \beta_2 - \alpha_3 - \beta_3 - \cdots - \beta_{n-1} - \alpha_n$ (1)

(式1中、 $\alpha_1 \sim \alpha_n$ は11～19個のアミノ酸からなるそれぞれ異なるアミノ酸配列であって、かつヒトにおいてスギアレルゲンタンパク質C_ry_jまたはC_ry_j2由来のT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列を表し； $\beta_1 \sim \beta_{n-1}$ は0～3個のアミノ酸からなる任意の同一のまたは異なるアミノ酸配列を表し；nは2以上の整数を表す)で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項2】 nが2～7のいずれかの整数である請求項1記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項3】 nが4～7のいずれかの整数である請求項1記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項4】 nが6または7である請求項1記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項5】 $\beta_1 \sim \beta_{n-1}$ が0または1個のアミノ酸からなる任意の同一のまたは異なるアミノ酸配列である請求項1～4のいずれかに記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項6】 $\beta_1 \sim \beta_{n-1}$ が全てチロシンである請求項1～5のいずれかに記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項7】 $\alpha_1 \sim \alpha_n$ がそれぞれ異なるアミノ酸配列であって、配列表の配列番号7～11に示されるアミノ酸配列中の連続した11～14個のアミノ酸からなるアミノ酸配列、配列番号16に示されるアミノ酸配列中の連続した11～16個のアミノ酸からなるアミノ酸配列、および、配列番号17に示されるアミノ酸配列中の連続した11～19個のアミノ酸からなるアミノ酸配列からなる群より選択される請求項1～6のいずれかに記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項8】 $\alpha_1 \sim \alpha_n$ がそれぞれ異なるアミノ酸配列であって、配列表の配列番号7～11に示されるアミノ酸配列中の連続した11～14個のアミノ酸からなるアミノ酸配列、配列番号16に示されるアミノ酸配列中の連続した14～16個のアミノ酸からなるアミノ酸配列、および、配列番号17に示されるアミノ酸配列中の連続した18または19個のアミノ酸からなるアミノ酸配列からなる群より選択される請求項1～6のいずれかに記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項9】 配列表の配列番号7～11に示されるアミノ酸配列中の連続した11～14個のアミノ酸からなるアミノ酸配列、配列番号16に示されるアミノ酸配列中の連続した14～16個のアミノ酸からなるアミノ酸配列、および、配列番号17に示されるアミノ酸配列中

* * 【請求項1】 式1：

 $\alpha_1 - \beta_1 - \cdots - \beta_{n-1} - \alpha_n$ (1)

の連続した18または19個のアミノ酸からなるアミノ酸配列からなる群が、配列番号7のアミノ酸番号4～14のアミノ酸配列、配列番号7のアミノ酸番号4～15のアミノ酸配列、配列番号7のアミノ酸番号3～15のアミノ酸配列、配列番号8のアミノ酸番号5～15のアミノ酸配列、配列番号8のアミノ酸番号5～16のアミノ酸配列、配列番号8のアミノ酸番号4～16のアミノ酸配列、配列番号9のアミノ酸番号4～14のアミノ酸配列、配列番号9のアミノ酸番号4～15のアミノ酸配列、配列番号9のアミノ酸番号3～14のアミノ酸配列、配列番号10のアミノ酸番号4～14のアミノ酸配列、配列番号10のアミノ酸番号4～15のアミノ酸配列、配列番号10のアミノ酸番号3～15のアミノ酸配列、配列番号11のアミノ酸番号4～14のアミノ酸配列、配列番号11のアミノ酸番号3～14のアミノ酸配列、配列番号11のアミノ酸番号3～15のアミノ酸配列、配列番号16のアミノ酸番号6～18のアミノ酸配列、配列番号16のアミノ酸番号7～20のアミノ酸配列、配列番号16のアミノ酸番号6～21のアミノ酸配列、配列番号17のアミノ酸番号3～21のアミノ酸配列、配列番号17のアミノ酸番号3～20のアミノ酸配列、および配列番号17のアミノ酸番号2～20のアミノ酸配列である請求項8記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項10】 式1に表されるアミノ酸配列が、配列表の配列番号1～6、12～15および18～20のアミノ酸配列からなる群より選択されるものである請求項3記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体。

【請求項11】 請求項1～10のいずれかに記載のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体を有効成分として含む抗スギ花粉症剤。

【請求項12】 スギ花粉症の治療に用いる請求項1記載の抗スギ花粉症剤。

【請求項13】 スギ花粉症の予防に用いる請求項1記載の抗スギ花粉症剤。

【発明の詳細な説明】

40 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、スギ花粉アレルゲンに特異的に反応するヒトT細胞を不活性化するペプチド、およびそのペプチドを有効成分として含んでなる免疫療法剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ここ数十年来、我が国においては、春になるとスギ花粉症による鼻炎や結膜炎を訴える人の数が増加し続けている。スギ花粉症はアレルギー症の一症であり、その主因はスギ花粉中の抗原性物質、すなわちスギ花粉アレルゲンであるといわれている。大気中に飛

(3)

特開平10-259198

3

散したスギ花粉がヒトの体内に侵入すると、スギ花粉アレルゲンに対するイムノグロブリンE抗体が産生される。この状態で次にスギ花粉が侵入すると、その花粉中のアレルゲンとこのイムノグロブリンE抗体が免疫反応を起こし、アレルギー症状を呈することになる。

【0003】スギ花粉中には抗原性の相違する少なくとも二種類のアレルゲンが存在することが現在までに知られている。その一つは、ヤスエダらの文献【J. Allergy Clin. Immunol. 71, 77-85 (1983)】に報告されている「Cry j 1」と呼ばれるタンパク質であり、もう一つはタニアイらの文献【FEBS Letters, 239, 329-332 (1988)】やサカグチらの文献【アレルギー、第45号、309-312頁 (1990年)】に報告されている「Cry j 2」と呼ばれるタンパク質である。なお、Cry j 1, Cry j 2ともに現在までにその全アミノ酸配列が決定されている【WO93/01213および特表平8-505284号公報参照】。スギ花粉中には、通常Cry j 1とCry j 2が約50:1ないし5:1の割合で存在し、花粉症患者から採取した血清のほとんどがCry j 1にもCry j 2にも反応するといわれている。なお、澤谷らの文献【アレルギー、第42巻、738-747頁 (1993年)】には、皮内反応試験やRAST試験において、Cry j 1とCry j 2は同程度の抗原性を発揮すると報告されている。

【0004】このように、スギ花粉アレルゲンが既にいくつかが単離され、その性質、性状もある程度解明されたことから、精製スギ花粉アレルゲンをヒトに投与して減感作することにより、スギ花粉症を治療・予防できる見通しがついてきた。最近ではそのための減感作剤もいくつか考案されており、例えば特開平1-156926号公報や特開平3-93730号公報には、N末端からのアミノ酸配列がAsp-Asn-Pro-Ile-Asp-SerまたはAla-Ile-Asn-Ile-Phe-Asnで表わされるスギ花粉アレルゲンに糖質を共有結合せしめ、生成した複合体を減感作剤としてヒトに投与する提案がなされている。

【0005】しかしながら、アレルギー症の診断や減感作療法には、通常高純度のアレルゲンが大量に必要とされ、スギ花粉中のアレルゲンは僅少である上に安定性が低く、スギ花粉症の診断剤や減感作剤をスギ花粉だけ頼ねうとすると、多大の困難が伴う。このようなことから、最近のアレルギー疾患の治療・予防においては、これまでのように、患者にアレルゲン全体を投与するのではなく、アレルゲン中のT細胞が特異的に認識する最小領域、すなわち、本質的にT細胞エピトープのみからなる低分子のペプチドを投与する免疫療法が注目されている。

【0006】一般に、アレルゲンは、マクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれると、そこで消化され、消化断片が抗原提示細胞表面のHLA (Human Leukocyte*

* e Antigen) タンパク質に結合し、抗原提示されることとなる。抗原提示される断片は、HLAタンパク質に対する親和性などにより、アレルゲンにおける一部の特定領域に限られ、かかる領域のうち、T細胞が特異的に認識する領域は、通常「T細胞エピトープ」と呼ばれる。実質的にT細胞エピトープのみからなるペプチドを投与する免疫療法には、

【0007】(i) ペプチドがB細胞エピトープを欠いている、すなわち、アレルゲンに特異的なイムノグロブリンE抗体が反応しないので、従来の粗製または精製アレルゲンで頻発していたアナフィラキシーなどの副作用が起り得ない；

(ii) 少量からスタートし、有効投与量に達するまでの期間が、従来の減感作剤に比較して大幅に短縮できる；

(iii) 経口免疫寛容を説明し、アレルゲンに対するアレルギー反応を減弱することができる、などの利点がある。ただし、全てのスギ花粉症患者が共通のT細胞エピトープに一樣に反応するわけではなく、

20 1種類のT細胞エピトープのみを投与しても効果がない場合もあるので、まず患者がどのT細胞エピトープに反応するかを調べてから投与するか、もしくは複数のT細胞エピトープを調製してそれらを同時に投与しなければ確実な効果は期待できない。しかしながら、前者の方法では予め患者がどのT細胞エピトープに反応するかを調べなければならない、また後者の方法では複数のT細胞エピトープを別々に調製しなければならない。

【0008】そこで近年、複数の異なるT細胞エピトープを人工的に連結したペプチドを使用する試みがなされている【例えば、特表平7-503362号公報参照】。だが、スギ花粉アレルゲン由来のヒトT細胞エピトープで同様の効果が得られることは全く知られていない。また、特表平8-505284号公報にはスギ花粉アレルゲンCry j 2の全アミノ酸配列およびCry j 2由来のT細胞エピトープについての記載があるが、そこで例示されている13アミノ酸からなるペプチドにはT細胞エピトープとしての活性がないことが示されている。すなわち、Cry j 2の全アミノ酸配列のどの部位にヒトT細胞エピトープが存在するかも実験的に確定されていなかった。

【0009】
【発明が解決しようとする課題】本発明の第一の課題は、スギ花粉アレルゲン由来の異なる複数のヒトT細胞エピトープのアミノ酸配列が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを提供することにある。また、本発明の第二の課題は、有効成分として上記ペプチドを含んでなる抗スギ花粉症剤を提供することにある。

【0010】
【課題を解決するための手段】本発明は、式1：

$$\alpha_1 - \beta_1 - \alpha_2 - \beta_2 - \alpha_3 - \beta_3 - \cdots - \beta_{n-1} - \alpha_n \quad (1)$$

(4)

特開平10-259198

5

(式1中、 α_1 ～ α_n は11～19個のアミノ酸からなるそれぞれ異なるアミノ酸配列であって、かつヒトにおいてスギアレルゲンタンパク質C₁y₁またはC₁y₂由来のT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列を表し； β_1 ～ β_n は0～3個のアミノ酸からなる任意の同一のまたは異なるアミノ酸配列を表し；nは2以上の整数を表す)で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体を提供する。ここで、「それぞれ異なる」とは、連続した5個以上のアミノ酸からなるアミノ酸配列がそれぞれ他と一致しないことをいうものとする。また、本発明は、式1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体を有効成分として含む抗スギ花粉症剤も提供する。

【0011】以下、本発明を詳しく説明する。本発明のペプチドは、好ましくは以下に定義するA群、B群、C群、D群、E群、F群およびG群の各アミノ酸配列群から1つずつ選ばれる2ないし7種類、より好ましくは4ないし7種類、最も好ましくは6または7種類のアミノ酸配列を順不同に連続したものである：

【0012】A群：配列表の配列番号7に示されるアミノ酸配列中の連続した11ないし14アミノ酸からなるアミノ酸配列であって、ヒトT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列からなる群；

B群：配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列中の連続した11ないし14アミノ酸からなるアミノ酸配列であって、ヒトT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列からなる群；

C群：配列表の配列番号9に示されるアミノ酸配列中の連続した11ないし14アミノ酸からなるアミノ酸配列であって、ヒトT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列からなる群；

【0013】D群：配列表の配列番号10に示されるアミノ酸配列中の連続した11ないし14アミノ酸からなるアミノ酸配列であって、ヒトT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列からなる群；

E群：配列表の配列番号11に示されるアミノ酸配列中の連続した11ないし14アミノ酸からなるアミノ酸配列であって、ヒトT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列からなる群；

F群：配列表の配列番号12に示されるアミノ酸配列中の連続した11ないし14アミノ酸からなるアミノ酸配列であって、ヒトT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列からなる群；

G群：配列表の配列番号13に示されるアミノ酸配列中の連続した11ないし19アミノ酸からなるアミノ酸配列、好ましくは18または19アミノ酸からなるアミノ酸配列であって、ヒトT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列からなる群。

【0014】ここに、「ヒトにおいてスギアレルゲンタ

ンパク質C₁y₁またはC₁y₂由来のT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列」とは、スギ花粉症患者由来の末梢血単核細胞群を該アミノ酸配列を有するペプチドの存在下で培養したときに、該末梢血単核細胞群のDNA合成速度を、該アミノ酸配列を有するペプチドの非存在下で培養した末梢血単核細胞群の2倍以上にする活性を有するようなアミノ酸配列をいう。また、上記各群に含まれるアミノ酸配列として好適なものは、例えば以下に記載するアミノ酸配列である：

10 【0015】A群
A : Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser
(配列表の配列番号7のアミノ酸番号4～14)；
A' : Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Tyr (配列表の配列番号7のアミノ酸番号4～15)
A'' : Asp-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser (配列表の配列番号7のアミノ酸番号3～15)
【0016】B群
B : Gln-Phe-Ala-Lys-Leu-Thr-Gly-Phe-Thr-Leu-Met
(配列表の配列番号8のアミノ酸番号5～15)
B' : Gln-Phe-Ala-Lys-Leu-Thr-Gly-Phe-Thr-Leu-Met-Gly (配列表の配列番号8のアミノ酸番号5～16)
B'' : Leu-Gln-Phe-Ala-Lys-Leu-Thr-Gly-Phe-Thr-Leu-Met-Gly (配列表の配列番号8のアミノ酸番号4～16)
【0017】C群
C : Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn
(配列表の配列番号9のアミノ酸番号4～14)；
C' : Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Thr (配列表の配列番号9のアミノ酸番号4～15)
30 C'' : Ile-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn (配列表の配列番号9のアミノ酸番号3～14)
【0018】D群
D : Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu
(配列表の配列番号10のアミノ酸番号4～14)
D' : Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn (配列表の配列番号10のアミノ酸番号4～15)
D'' : Leu-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn (配列表の配列番号10のアミノ酸番号3～15)
【0019】E群
E : Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly
(配列表の配列番号11のアミノ酸番号4～14)
E' : Ser-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly (配列表の配列番号11のアミノ酸番号3～14)
E'' : Ser-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly-Pro (配列表の配列番号11のアミノ酸番号3～15)
【0020】F群
F : Tyr-Gly-Leu-Val-His-Val-Ala-Asn-Asn-Asn-Tyr-Asp-Pro (配列表の配列番号12のアミノ酸番号6～1)

(5)

特開平10-259198

8

7

8) :

F' : Gly-Leu-Val-His-Val-Ala-Asn-Asn-Asn-Tyr-Asp-Pro-Trp-Thr (配列表の配列番号16のアミノ酸番号7-20) ;

F' : Tyr-Gly-Leu-Val-His-Val-Ala-Asn-Asn-Asn-Tyr-Asp-Pro-Trp-Thr-Ile (配列表の配列番号16のアミノ酸番号6-21) ;

【0021】G群

G : Ser-Gly-Lys-Tyr-Glu-Gly-Gly-Asn-Ile-Tyr-Thr-Lys-Lys-Glu-Ala-Phe-Asn-Val-Glu (配列表の配列番号17のアミノ酸番号3-21) ;

G' : Ser-Gly-Lys-Tyr-Glu-Gly-Gly-Asn-Ile-Tyr-Thr-Lys-Lys-Glu-Ala-Phe-Asn-Val (配列表の配列番号17のアミノ酸番号3-20) ;

G' : Ser-Ser-Gly-Lys-Tyr-Glu-Gly-Gly-Asn-Ile-Tyr-Thr-Lys-Lys-Glu-Ala-Phe-Asn-Val (配列表の配列番号17のアミノ酸番号2-20) ;

【0022】上記において、E、FおよびG群はスキ花粉アレルゲンCry j 1由来のヒト主要T細胞エピトープを構成するアミノ酸配列の群であり、その他の群は全てCry j 2由来のヒト主要T細胞エピトープを構成するアミノ酸配列の群である。さらに、本発明における好ましいペプチドの例は以下に記載する通りである。

(1) Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu (ペプチド1:配列表の配列番号1)

(2) Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser (ペプチド2:配列表の配列番号2)

(3) Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn (ペプチド3:配列表の配列番号3)

【0023】(4) Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Tyr-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Tyr-Ser-Tyr-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu (ペプチド4:配列表の配列番号4)

(5) Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Tyr-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Tyr-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser (ペプチド5:配列表の配列番号5)

(6) Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Tyr-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Tyr-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn (ペプチド6:配列表の配列番号6)

【0024】(7) Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Thr-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-

10 Phe-Gly-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn (ペプチド7:配列表の配列番号12) ;

(8) Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Thr-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp (ペプチド8:配列表の配列番号13) ;

(9) Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp (ペプチド9:配列表の配列番号14) ;

【0025】(10) Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp (ペプチド10:配列表の配列番号15) ;

(11) Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Thr-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly (ペプチド11:配列表の配列番号16) ;

(12) Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Thr (ペプチド12:配列表の配列番号19) ;

【0026】(13) Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp-Ser-Met-Lys-Val-Thr-Val-Ala-Phe-Asn-Gln-Phe-Gly-Pro-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Thr-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Lys-Ile-Ala-Ser-Cys-Leu-Asn-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser-Trp-Phe-Ala-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Gln-Lys-Asn-Thr (ペプチド13:配列表の配列番号20) ;

【0027】なお、上記(1)は、スキ花粉アレルゲンタンパク質Cry j 2のヒト主要T細胞エピトープを構成するアミノ酸配列が、N末端からC-A-Dの順に連続したアミノ酸配列である。同様に、上記(2)はCry j 2のヒト主要T細胞エピトープがN末端からD-C-Aの順に連続したアミノ酸配列、上記(3)はN末端からA-D-Cの順に連続したアミノ酸配列である。

【0028】また、上記(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)はスキ花粉アレルゲンタンパク質Cry j 1およびCry j 2のヒト主要T細胞エピトープを構成するアミノ酸配列が、それぞれN末端からA'-C'-E-D'、D'-C'-E-A'、A'-E-C'-D'、D'-E-C'-A'、C'-A'-D'-E、E-D'-A'-C'の順に連続したアミノ酸配列である。また上記(13)は、同様にN末端から

(6)

特開平10-259198

9

A' - E' - C' - D' - F - Gの順に連続したアミノ酸配列である。

【0029】さらに、上記(4)は、呑T細胞エピトープを構成するアミノ酸配列の間にチロシン(Y)が1残基ずつ挿入され、N末端からC-Y-A-Y-Dの順に連続したアミノ酸配列である。同様に、上記(5)はN末端からD-Y-C-Y-Aの順に連続したアミノ酸配列。上記(6)はN末端からA-Y-D-Y-Cの順に連続したアミノ酸配列である。

【0030】また、上記(1)ないし(13)以外のT細胞エピトープの順列、すなわち、A-C-D, C-D-AまたはD-A-C; A-Y-C-Y-D, C-Y-D-Y-AまたはD-Y-A-Y-C; ましくはA'-C'-D'-E, A'-D'-C'-E, A'-D'-E-C', A'-E-D'-C', C'-A'-D'-E, C'-A'-E-D', C'-D'-A'-E, C'-D'-E-A', C'-E-A'-D', C'-E-D'-A', D'-A'-C'-E, D'-A'-E-C', D'-C'-A'-E, D'-E-A'-C', E-A'-C'-D', E-A'-D'-C', E-C'-A'-D', E-C'-D'-A', E-D'-A'-C'またはE-D'-C'-A', A'-E-C'-D'-F-G, A'-E'-C'-D'-G-FまたはA'-E-C'-D'-G-F等も、本発明のペプチドとして好適である。

【0031】また、本発明のペプチドは、上記(4)ないし(6)のごとく、スキ花粉アレルゲンのヒト主要T細胞エピトープ同士の間に、T細胞エピトープの構成とは無関係のアミノ酸配列(式1中のβ)を介在させたものも包含する。本発明においては、そのような介在アミノ酸配列の長さは1ないし3アミノ酸である。またそのアミノ酸配列は特に限定されないが、そのような介在アミノ酸配列として、例えば上記(4)ないし(6)で用いられているチロシンを挙げることができる。あるいは、ヒト体内に存在するプロテアーゼにより特異的に認識・切断され得るアミノ酸配列であってもよい。そのようなアミノ酸配列としては、例えばカテブシンB(EC 3.4.22.1)によって切断され得るArg; カテブシンD(EC 3.4.23.5)によって切断され得るLeu-Tyr, Tyr-Leu, Phe-Phe, Phe-TyrおよびLeu-Phe; カテブシンE(EC 3.4.23.34)によって切断され得るPhe-Phe, Phe-Ile, Phe-Val, Tyr-ValおよびLeu-Phe等を挙げることができる。

【0032】さらに、本発明のペプチドは、上記のような構成に加えて、そのN末端および/またはC末端に、T細胞エピトープの構成とは無関係の付加的アミノ酸配列が存在するものも包含する。そのような付加的アミノ酸配列は、本発明のペプチドのT細胞エピトープ供与体としての機能を損なうようなものや、またはヒトに投与された際に毒性等これらかの有害な活性を有するようなも

10

のでない限り、特に限定されない。

【0033】

【発明の実施の形態】本発明に記載のペプチドは、「固相法」または「液相法」として知られる熒光において簡易のペプチド合成法により、容易に調製することができる。例えば、社団法人日本生化学会編「新生化学実験講座」、第1巻、「タンパク質V!」、第3~44頁、1992年、東京化学同人発行などにはペプチド合成の詳細が記載されている。また、該ペプチドは、マルチペプチドシンセサイザー(シンフォニー; プロテインテクノロジー社製)を用い、Fmoc(9-fluorenyl methylloxycarbonyl)固相合成法にて同装置のプロトコールに従って合成することができる。すなわち、合成する各ペプチドのC末端に相当するアミノ酸が導入されているFmoc-L-アミノ酸Wang樹脂を上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、デプロテクション溶液を用いてFmocを除く。さらにC末端から2番目のアミノ酸に相当するアミノ酸溶液とアクチペータ溶液を反応せしめ、反応後再びFmoc基のデプロテクションを行い、同様の操作を繰り返すことにより、目的とするペプチドを合成することができる。

【0034】本発明のペプチドは化学合成により調製されたものに限定されず、組換えDNA技術により調製したものであってもよく、例えば、上記(1)ないし(13)に記載されたアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、これを自立増殖可能なベクターに挿入したものを大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母等の適宜宿主に導入して形質転換体とし、その培養物から本発明のペプチドを採取してもよい。所望のスクレオチド配列を有するDNAを調製する方法としては、例えば、該所望のDNAの部分配列スクレオチドであって、両端がオーバーラップするようなセンスおよびアンチセンススクレオチドを化学合成し、次いでポリメラーゼ連鎖反応[Saiki, R. K. et al (1988) Science 239, 487-491参照]等のDNAポリメラーゼ反応を利用することにより、それら部分配列が連結したものを得る方法等が挙げられる。

【0035】上記のごとくして得られる本発明のペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAを好適なベクターに組み込むことにより、原核生物または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質転換にかかる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において該DNAを発現させることができる。原核細胞の宿主としては、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)や枯草菌(*Bacillus subtilis*)等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質発現させるには、宿主と適合し得る担子菌のレブリコン、すなわち複製起点および調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させればよい。またベクターは形質転換細胞に表現形質(表現型)の遺伝性を付与することができる

(7)

特開平10-259198

11

配列を持つものがほしい。

【0036】例えば大腸菌としては λ 、 $c o l i$ K1 2株等がよく用いられ、ベクターとしては一般にpBR 322やpUC系のプラスミドがよく用いられるが、これに限定されず、公知の各種の菌株及びベクターがいずれも利用できる。プロモーターとしては、大腸菌においてはトリプトファン(trp)プロモーター、ラクトース(lac)プロモーター、トリプトファン・ラクトース(tac)プロモーター、リボプロテイン(lpp)プロモーター、バクテリオファージ由来のラムダ(λ)PLプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子Tu(tuPB)プロモーター等が挙げられ、どのプロモーターも本発明のペプチドの產生に使用することができる。

【0037】結草菌としては、例えば207-25株がほしい、ベクターとしてはpTUB228 [Ohmura, K., et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93 参照] 等が用いられるが、これに限定されるものではない。結草菌用プロモーターとしては、結草菌の α -アミラーゼ遺伝子の調節配列がよく用いられ、さらに必要により α -アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードするDNA配列を追加することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

【0038】宿主細胞として大腸菌を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、pBR322複製起点を有し、大腸菌において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、翻訳開始シグナルを備えたものを用いることができる。該発現ベクターはカルシウムークロライド法 [Mandel, M. and Higa, A. (1970) J. Mol. Biol. 53, 154 参照]、Hanahan の方法 [Hanahan, D. and Meselson, M. (1980) Gene 10, 63 参照] および電気パルス穿孔法 [Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照] 等により大腸菌に取り込まれることができ、かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0039】真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞 [Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182 参照] やチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) のシヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 参照]、ヒトナマルバ細胞、ハムスターBHK細胞等がよく用いられるが、これらに限定されない。

【0040】脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現させようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr [Subramani, S., et al. (1981) Mo-

12

1. Cell. Biol. 1, 854-864 参照] 等を例示できるが、これに限定されない。

【0041】また真核微生物としては酵母が一般によく用いられており、その中でもサッカロミセス酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) がほしい。該酵母等の真核生物の発現ベクターとしては、例えばアルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター [Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025 参照] や酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター [Miyamoto, A., et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5 参照] 等を好ましく利用できる。

【0042】宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自立増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターはDEAE-デキストラノン法 [Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308 参照]、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 [Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology 52, 456-457 参照] および電気パルス穿孔法 [Neumann, E., et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845 参照] 等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共にG418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo [Sambrook, J., et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY 参照] やpSV2neo [Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1, 327-341 参照] 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより本発明のペプチドを安定に产生する形質転換細胞を得ることができる。

【0043】上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞外に本発明のポリペプチドが生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、大腸菌であればトリプトニーイースト培地 (バクトトリプトン 1.6%、イーストエキストラクト 1.0%、NaCl 0.5% (pH 7.0)) やペプトン培地 (ディフコ社製) 等を使用できる。また、上記COS細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 等の培地に必要に応じウシ胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したものを使用できる。

【0044】上記により、形質転換体の細胞内または細胞外に生産される本発明のペプチドは、該蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作

(8)

特開平10-259198

13

法により、分離・精製することができる。かかる方法としては、具体的には例えば通常の蛋白質沈澱剤による処理、閾外ろ過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲルろ過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

【0045】外来遺伝子を大腸菌等に導入して大量発現させた場合、産生されたペプチドが、封入体と呼ばれる水に不溶の雑塊を形成することがある。そのような場合、グアニジンイソチオシアネート等の強力な変性剤を用いて該ペプチドを変性させることにより該ペプチドを可溶化することができる。さらに、本発明のペプチドは、かくして得られるペプチドに糖質やポリエチレン glycol を付加して得られる複合体としての形態、さらには、ペプチドをアセチル化、アミド化および/または多官能試薬により架橋重合させて得られる誘導体または重合体としての形態であってもよい。

【0046】そのような本発明のペプチドの複合体、誘導体および重合体の製造にあたっては、糖質等の付加、アセチル化、アミド化および/または架橋重合は、本発明のペプチド中のスギ花粉アレルゲンタンパク質由来のヒトT細胞エピトープを構成するアミノ酸配列の機能を損なわないよう、前記した本発明のペプチドのN末端および/またはC末端の付加的ペプチド、もしくは介在ペプチドにおいて行われることが好ましい。

【0047】本発明のペプチドの複合体としては、例えばN末端またはLys残基のアミノ基にポリエチレン glycol、モノメトキシポリエチレン glycol、デキストラン、さらには、ブルラン、エルシナンなどのマルトオリオースを反復単位とする多糖鎖を付加したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知のものを挙げることができ、これらは例えば社団法人日本生化学会編「新生化学実験講座」第1巻「タンパク質Ⅴ」第236~252頁（1991年、東京化学同人発行）等の記載に従って製造することができる。

【0048】また、本発明のペプチドの誘導体としては、例えばN末端をアセチル化したもの、C末端Gly残基をアミド化したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知のものを挙げることができる。かかる誘導体は、例えば「新生化学実験講座」第1巻「タンパク質Ⅴ」第18~20頁および同第9巻「ホルモン」第290頁~298頁（いずれも1991年、東京化学同人発行）等の記載に従って製造することができる。さらに、本発明のペプチドの重合体としては、例えばシスクシンイミジルスペレート等の二価性架橋試薬により本発明のペプチド2分子を重合したもの等、本発明の技術分野における当業者に周知のものを挙げることができる。かかる重合体の調製は、例えば「新生化学実験講座」第1巻「タンパク質Ⅴ」第207~226頁の記載に従って

14

行うことができる。

【0049】本発明のペプチドは、比較的粗な形態で投与しても所期の治療・予防効果を発揮するが、通常は使用に先立って精製される。精製には、例えば、透過、濃縮、遠心分離、ゲル滲過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などのペプチドないしタンパク質を精製するための斯界における慣用の方法が用いられ、必要に応じて、これら方法を適宜組合せればよい。そして、最終使用形態に応じて、精製したペプチドを濃縮、凍結乾燥して液状または固状にすればよい。本発明のペプチドがT細胞エピトープとしての活性を有することは、スギ花粉アレルゲンに特異的なT細胞のトリチウム化チミジンの取込みを計測することにより確認することができる。この計測には、例えば以下に記載する方法を用いることができる。

【0050】すなわち、フィコール・ハイバック比重遠心法等により花粉症患者の末梢血單核細胞群を分離し、この細胞群を RPMI 1640 等の培地に浮遊させ、96穴マイクロプレート上に分注する。次に、被検物質であるペプチドを加え培養する。この培養時の温度、時間等の条件は各実験毎に適宜調整することができるが、37°C、3日間が好適である。その後トリチウム化チミジンを培地に加え、さらに一定時間培養を続け、单核細胞群におけるトリチウム化チミジンの取込み量を測定することにより、本発明のペプチドのT細胞エピトープとしての活性を算定することができる。なお、本発明では、同時にペプチドを含まない系を設けてこれを陰性対照とし、トリチウム化チミジンの取込み量が陰性対照の2倍以上に達した系を「陽性」、達しなかった系を「陰性」とした。

【0051】本発明のペプチドがスギ花粉症に対する治療効果を有することは、例えば以下の実験により確認することができる。なお、本発明のペプチドはヒトT細胞特異的な活性を有するため、ヒト以外の動物で実験を行なってもその効果が現れない場合があるが、例えばC3H/HeNマウスのリンパ球は上記A群に包含されるペプチドに対して反応性を有するので、A群のアミノ酸配列を含むペプチドに関しては以下に記載するような方法でその効果を評価することができる。

【0052】予めC3H/HeNマウスに対し本発明のペプチドを投与しておく。一定期間経過後に当該マウスに以下に記載する配列を有するC₁y₂のヒト主要T細胞エピトープペプチド：Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser（ペプチド14；配列表の配列番号7のアミノ酸番号4~14）

50 をフロイントの完全アジュバント等のアジュバントとと

(9)

15

もに投与し免疫する。さらに、一定期間経過後に当該実験動物より腋窩部等からリンパ節細胞を摘出し細胞懸濁液を調製する。これに上記ペプチド14またはCryj2を添加して培養を継続し、さらにトリチウム化チミジンを添加して、トリチウム化チミジンの取り込み量を測定することにより、T細胞の増殖を測定することができる。

【0053】予め本発明のペプチドを投与していないマウスでは、ペプチド14による免疫化によりそのT細胞がペプチド14またはCryj2に反応し増殖する。一方、予め本発明のペプチドを投与し、免疫対応を誘導したマウスでは、その後ペプチド14による免疫を行なってもT細胞がペプチド14またはCryj2に反応せず増殖しない。その差を測定することにより、本発明のペプチドのスギ花粉症に対する治療効果を確認することができる。本発明のペプチドは、スギ花粉アレルゲンに特異的なイムノグロブリンE抗体と免疫的に反応しないので、ヒトを含む哺乳類一般に投与すると、免疫的にアナフィラキシーを引き起こすことなく、スギ花粉アレルゲンに特異的なT細胞を不活性化することができる。

【0054】本発明のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体を有効成分として含む本発明の抗スギ花粉症剤は、ヒトを含む哺乳類一般に投与すると、免疫的にアナフィラキシーを引き起こすことなくスギ花粉症に対して顕著な治療効果を発揮する。本発明のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体を有効成分として含む抗スギ花粉症剤は、スギ花粉症に罹患したヒトを含む哺乳類一般に投与すると、アナフィラキシーなどの副作用を免疫的に引き起こすことなく、スギ花粉症を治療することができる。一方、本発明のスギ花粉症剤をスギ花粉が飛散しはじめる前に健常な個体や潜在的なスギ花粉症の個体に投与するときには、スギ花粉症に対して顕著な予防効果を発揮するとともに、発症時のアレルギー症状の対応に著効を発揮する。

【0055】本発明の抗スギ花粉症剤につきさらに詳しく説明すると、本発明の抗スギ花粉症剤は通常、本発明のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体の1種または2種以上を0.01ないし1.00% (w/w)、好ましくは0.05ないし0.50% (w/w)、さらに好ましくは0.5ないし5.0% (w/w) 含んでなる。本発明の抗スギ花粉症剤は、当該ペプチドなどの有効成分の単独の形態はもとより、それ以外に生理的に許容される、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、グルコース、シーカロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、マンニトール、ブルランなどの摂取、賦形剤、免疫助剤、安定剤、さらには必要に応じてステロイドホルモンやクリモグリク酸ナトリウムなどの抗炎症剤や抗ヒスタミン剤、抗ロイコトリエン剤、抗タキシニン剤を含む1種または2種以上の他の薬剤と組み合わせた組成

特開平10-259198

16

物としての形態を包含する。さらに、本発明の抗スギ花粉症剤は、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、本発明のペプチド、その複合体、その誘導体、またはその重合体を、例えば、1日当たりの用薬またはその整数倍(4倍まで)またはその約数(1/40まで)に相当する量を含有し、投与に適する物理的に分離した一体の剤形にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、散剤、細粒剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、軟膏剤、硬膏剤、パフ剤、坐剤、点眼剤、点鼻剤、噴霧剤、注射剤などが挙げられる。

【0056】本発明の抗スギ花粉症剤の使用方法について説明すると、本発明の抗スギ花粉症剤は、スギ花粉症の治療・予防を目的に、ヒトを含む哺乳類一般に経皮、経口、点鼻、点眼または注射投与される。ヒトにおける投薬量は、投与の方法や症状によっても変わるが、通常、対象者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人1日当たり0.01ないし1.0 g、好ましくは0.05ないし0.1 g (有効成分の量に換算) を目安に、1日1回ないし毎月1回の頻度で、約1ないし6ヶ月間、通常、用薬を増やしながら反復投与される。

【0057】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによりその技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】ペプチド1の合成

樹脂に固定したアミノ酸誘導体に、1個ずつアミノ酸をカルボキシル末端側から結合させていく方法(固相合成法)でペプチドを化学合成した。各サイクルで使用するアミノ酸は α アミノ基および残基部分の反応基が保護基でプロックされた特殊なアミノ酸誘導体を用いた。ここで、それぞれの α アミノ基がFmoc(9-フルオレニル-メチロキシカルボニル)によりプロックされているアミノ酸を用いた(Fmoc法)。また、ペプチド合成は樹脂に結合したアミノ酸の α アミノ基のFmocを脱保護し、次にカルボキシル基が活性化したアミノ酸誘導体を結合させるという反応を順次繰り返して行なった。

【0058】ペプチド1、2および3の各ペプチドは、ペプチド合成機(モデル430A:アブライド・バイオシステムズ社製)を用い上記のFmoc固相合成法にて同装置のファストモック法(Fastmoc Chemistry)に従って合成した。すなわち、合成するペプチドのC末端残基に相当するアミノ酸(Ser)が導入されているFmoc-Leu-Wang樹脂(0.69 mmol/g; アロカ社製)の1.00 μmol相当を上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、デプロテクション溶液(ビペリジン/N-メチルピロリドン(以下「NMP」という))7mLを3分間、12分間と2回反応させ、樹脂に結合しているアミノ酸のFmoc基を除き、7mLのNMPで5回洗浄した。

50 C末端側から2番目のアミノ酸に相当する1 mmolのFmoc

(10)

17

oc-Cys(Trt)に、アクリペーター溶液(2M ジイソブロビルエチルアミン(DIEA)/NMP 1m1と0.45M 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3,-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロスルfonyl (HBTU)/1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)/ジメチルホルムアミド(DMF) 2.2m1およびNMP 1m1)を加えて活性化したものと(結合アミノ酸に対して10倍等量)、先のFmoc基を除いた樹脂に結合しているアミノ酸を30分間室温で反応させた。ここで生成したFmoc-Cys(Trt)-Leu-Wang樹脂をNMP 7m1で7回洗浄後、再びFmoc基のデブロテクションを行い(ただしビペリシン濃度は1サイクル目は2.3%から3サイクル目は4.2%と合成するペプチドの長さに従って順次上昇させた。) NMP 7m1で5回洗浄後、活性化Fmoc-Ser(tBu)溶液と反応させた。

【0059】同様の操作を繰り返すことにより、目的とする保護ペプチド樹脂(Fmoc-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Wang樹脂)を合成した。

【0060】本実施例以下のペプチド合成に使用したアミノ酸は以下の通りである:

Fmoc-Ala、Fmoc-Arg(Pmc)、Fmoc-Asn(Trt)、Fmoc-Asp(OtBu)、Fmoc-Cys(Trt)、Fmoc-Gln(Trt)、Fmoc-Glu(OtBu)、Fmoc-Gly、Fmoc-His(Trt)、Fmoc-Ile、Fmoc-Leu、Fmoc-Lys(Boc)、Fmoc-Met、Fmoc-Phe、Fmoc-Pro、Fmoc-Ser(tBu)、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Trp(Boc)、Fmoc-Tyr(tBu)、Fmoc-Val。

()内は残基部分の反応基を保護する保護基を表す:(株)パーキンエルマージャパンアブライドバイオシステムズ事業部(製)

【0061】まず、上記のように合成し得られた保護ペプチド樹脂(Fmoc-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Wang樹脂)にデブロテクション溶液7m1を3分間、12分間と2回反応させてN末端Fmoc基を脱保護した。次に7m1のNMPにて6回洗浄後、ジクロロメタンにて3回洗浄し、さらにアルゴンガスを吹き付けることにより15分間乾燥させた。

【0062】樹脂を取り出し、クリベージ溶液(トリフ

(10)

18

特開平10-259198

ロロ酢酸(以下「TFA」という):フェノール:水:チオアニソール:エタングリオール=82.5:5:5:5:2.5)を5m1加え、室温で2時間反応させることにより樹脂からのペプチドの切断およびアミノ酸側鎖保護基の除去を行い、ペプチド溶液を得た[King, D. S. (1990) Int. J. Peptide Protein Res. 36, 255]。このペプチド溶液をフィルターを用いて通過し、滤液を遠心管に回収した。これに、40m1の冷エーテルを加え、ペプチドを沈殿させた。しばらく冷却後、これを遠心して(3000 rpm、10分間)沈殿物を集め、再び冷エーテルを加えて分散させては回収する操作を6回繰り返してペプチドを精済した。得られたペプチドを乾燥させ、粗ペプチド230mgを得た。以下、上記の操作を「クリベージ反応」という。

【0063】得られた粗ペプチドのうち76mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、高速液体クロマトグラフィー(以下「HPLC」という)に供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

20【0064】カラム:ODSカラム(TSK-gel ODS-120T、Φ21mm×300mm;東ソー(株)社製)
移動相:27-35%アセトニトリル/0.1% TFA、20分
流速:8m1/min
検出波長:230nm。

21~23分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするペプチド9mgを得た。この合成したペプチド100pmolについて、アミノ酸配列分析装置(PPSQ-10型;島津製作所(株)社製)を用いてアミノ酸配列分析を行なったところ、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0065】(実施例2)ペプチド2の合成
実施例1と同様の操作により、保護ペプチド樹脂(Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Wang樹脂)を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペプチド270mgを得た。得られた粗ペプチドのうち91mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0066】カラム:C4カラム(ワイエムシィーパック(YMC-Pack) C4-A.P.、Φ20mm×250mm;(株)ワイエムシィ社製)
移動相:27-35%アセトニトリル/0.1% TFA、30分
流速:7m1/min
検出波長:230nm。

(11)

特開平10-259198

19

16～18分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って目的とするペプチド4.7mgを得た。このペプチド100pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0067】〔実施例3〕ペプチド3の合成

実施例1と同様の操作でペプチド(Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Wang樹脂)を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペプチド210mgを得た。得られた粗ペプチドのうち70mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0068】カラム：オクタデシル-4PW (TSK-gel オクタデシル-4PW, φ21.5mm×150mm; 京ソー(株)社製)

移動相：25～40%アセトニトリル/0.1% TFA, 1.5分

流速：8ml/分

検出波長：230nm。

10～12分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするペプチド10mgを得た。このペプチド100pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0069】〔実施例4〕ペプチド4の合成

ペプチド4、5および6の各ペプチドは、マルチペプチドシンセサイザー(シンフオニー；プロテイン・テクノロジーズ社製)を用い、上記のFmoc固相合成法にて同様のプロトコールに従って合成した。すなわち、合成するペプチドのC末端残基に相当するアミノ酸(Leu)が導入されているFmoc-Leu-Wang樹脂(0.69mmol/g)の2.5μmol相当を上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、デプロテクション溶液(20%ビペリジン/ジメチルホルムアミド)1.25mlを5分間2回反応させ、樹脂に結合しているアミノ酸のFmoc基を除いた。樹脂をジメチルホルムアミド液1.25mlで30秒間6回洗浄し、C末端から2番目のアミノ酸に相当する100nMのFmoc-Cys(Trt)ジメチルホルムアミド溶液1.25mlに、100nMのアクリチベーター溶液(100mM O-ベンゾトリアゾール-N、N',N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロホスフェート/400mM N-メチルモルフォリン/ジメチルホルムアミド)1.25mlを加え(結合アミノ酸に対して5倍等量)、20分間室温で反応させた。ここで生成したFmoc-Leu-Cys(Trt)-Wang樹脂をジメチルホルムアミド1.25mlで30秒間6回洗浄後、再びFm

20

oc基のデプロテクションを行い、ジメチルホルムアミド1.25mlで30秒間6回洗浄後、Fmoc-Ser(tBu)溶液とアクリチベーター溶液を加え反応させた。同様の操作を繰り返すことにより、保護ペプチド樹脂(Fmoc-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Wang樹脂)を合成した。

【0070】上記のように合成し得られた保護ペプチド樹脂について、実施例1に記載した方法でクリベージ反応を行って、粗ペプチド50mgを得た。得られた粗ペプチドのうち9.5mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0071】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、φ21.5mm×75mm; 京ソー(株)社製)

移動相：25～40%アセトニトリル/0.1% TFA, 2.0分

流速：8ml/分

検出波長：220nm。

9～10分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするペプチド0.7mgを得た。このペプチド100pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0072】〔実施例5〕ペプチド5の合成

実施例4と同様の操作で保護ペプチド樹脂(Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Tyr(tBu)-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Wang樹脂)を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペプチド45mgを得た。得られた粗ペプチドのうち14mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0073】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、φ21.5mm×75mm; 京ソー(株)社製)

移動相：25～40%アセトニトリル/0.1% TFA, 2.0分

流速：8ml/分

検出波長：220nm。

12～13分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするペプチド1.0mgを得た。このペプチド100pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号

(12)

特開平10-259198

21

5に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0074】〔実施例6〕 ベブチド6の合成
 実施例4と同様の操作で保護ペブチド樹脂 (Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Tyr(tBu)-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp-Wang樹脂) を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペブチド4.2 mgを得た。得られた粗ペブチドのうち1.0 mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0075】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、Φ21.5 mm×75 mm；京ソー(株)社製)

移動相：25-27%アセトニトリル/0.1% TFA
 A. 15分

流速：8 mL/min

検出波長：220 nm。

14～15分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするペブチド0.9 mgを得た。このペブチド100 pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0076】〔実施例7〕 ベブチド7の合成
 実施例1と同様の操作により、保護ペブチド樹脂 (Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Phe-Ala-Ser(tBu)-Trp-Wang樹脂) を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペブチド5.32 mgを得た。得られた粗ペブチドのうち1.1 mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0077】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、Φ21.5 mm×75 mm；京ソー(株)社製)

移動相：30-50%アセトニトリル/0.1% TFA

A. 15分

流速：5 mL/min

検出波長：220 nm。

10～11.5分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って目的とするペブチド1.9 mgを得た。このペブチド500 pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号12に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0078】〔実施例8〕 ベブチド8の合成

22

実施例1と同様の操作により、保護ペブチド樹脂 (Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp-Wang樹脂) を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペブチド2.88 mgを得た。得られた粗ペブチドのうち1.2 mgを0.1%のTFAを含む10%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0079】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、Φ21.5 mm×75 mm；京ソー(株)社製)

移動相：35-55%アセトニトリル/0.1% TFA
 A. 15分

流速：5 mL/min

検出波長：220 nm。

29 7.5～8.5分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って目的とするペブチド4.9 mgを得た。このペブチド500 pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号13に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0080】〔実施例9〕 ベブチド9の合成
 実施例1と同様の操作により、保護ペブチド樹脂 (Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Phe-Ala-Ser(tBu)-Trp-Wang樹脂) を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペブチド3.40 mgを得た。得られた粗ペブチドのうち1.6 mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0081】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、Φ21.5 mm×75 mm；京ソー(株)社製)

移動相：30-50%アセトニトリル/0.1% TFA
 A. 15分

流速：5 mL/min

検出波長：220 nm。

10～13分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って目的とするペブチド6.8 mgを得た。このペブチド500 pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号14に示されるアミノ酸配列が確認された。

50 【0082】〔実施例10〕 ベブチド10の合成

(13)

23

実施例1と同様の操作により、保護ペプチド樹脂 (Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp-Wang樹脂) を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペプチド 4.4 mgを得た。得られた粗ペプチドのうち 8 mg を 0.1% の TFA を含む 20% アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLC に供した。HPLC の条件は以下の通りであった。

【0083】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、Φ21.5 mm × 75 mm；京ソー(株)社製)

移動相：30-45%アセトニトリル/0.1% TFA、15分

流速：5 ml/min

検出波長：220 nm。

11. 5~13分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って目的とするペプチド 3.0 mgを得た。このペプチド 500 pmol について、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号 15 に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0084】(実施例11) ペプチド11の合成

実施例1と同様の操作により、保護ペプチド樹脂 (Fmoc-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Wang樹脂) を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペプチドを得た。得られた粗ペプチドのうち 12.0 mg を 0.1% の TFA を含む 20% アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLC に供した。HPLC の条件は以下の通りであった。

【0085】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、Φ21.5 mm × 75 mm；京ソー(株)社製)

移動相：32-40%アセトニトリル/0.1% TFA、15分

流速：5 ml/min

検出波長：230 nm。

10~11.5分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするペプチド 12.5 mgを得た。このペプチド 100 pmol について、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号 18 に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0086】(実施例12) ペプチド12の合成

(15)

24

実施例1と同様の操作により、保護ペプチド樹脂 (Fmoc-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp-Wang樹脂) を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペプチドを得た。得られた粗ペプチドのうち 4.2 mg を 0.1% の TFA を含む 20% アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLC に供した。HPLC の条件は以下の通りであった。

【0087】カラム：ODSカラム (TSKガードカラムODS、Φ21.5 mm × 75 mm；京ソー(株)社製)

移動相：39-45%アセトニトリル/0.1% TFA、15分

流速：5 ml/min

検出波長：230 nm。

20. 7.5~10分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするペプチド 14.6 mgを得た。このペプチド 100 pmol について、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号 19 に示されるアミノ酸配列が確認された。

【0088】(実施例13) ペプチド13の合成

ペプチド13 (配列表の配列番号 20) の合成は、合成状況を確認し、また試薬を追加するため、以下に記載するように 5段階に分けて行なった。まず、実施例1に記載した方法 (ただし、1残基毎にアミノ酸の結合反応を 2 回繰り返して行なうダブルカップリング法を用いた) で C 末端から 16 残基目までのペプチドである Fmoc-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で反応を中断した。

【0089】一部樹脂を取り出し、0.5 ml の 20% ピペリジン/DMF にて脱Fmoc反応を 20 分間行い、その後、樹脂に 0.5 ml のペプチド13用クリベージ溶媒 (TFA：エタンジオール：水：トリイソプロピルシラン = 92.5:2.5:2.5:2.5) を加え、1時間クリベージ反応を行い、得られたペプチド溶液にエーテルを加えペプチドを沈殿させた。得られたペプチドについて質量分析計 (VG ブラットフォーム: VG バイオテック社製) を用い、エレクトロスプレー・イオナイゼーション (electrospray ionisation: ESI) 法にて分子量を測定し、合成産物の確認を行なった。

【0090】残りの樹脂を用いて引き続き合成を行い、C 末端から 26 残基までのペプチドである Fmoc-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-As

(14)

25

n(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、反応を中断した。一部樹脂を取り出し、脱Fmoc反応、およびクリベージ反応を行い、上記と同様に合成産物の確認を行なった。

【0091】残りの樹脂を用いて、合成を引き続き行い、C末端から46残基までのペプチドであるFmoc-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、反応を中断した。一部樹脂を取り出し、脱Fmoc反応およびクリベージ反応を行い、上記と同様に合成産物の確認を行なった。

【0092】残りの樹脂を用いて、合成を引き続き行い、C末端から65残基までのペプチドであるFmoc-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂が合成された時点で、反応を中断した。一部樹脂を取り出し、脱Fmoc反応、およびクリベージ反応を行い、上記と同様に合成産物の確認を行なった。

【0093】この時点で、目的とする分子量(718.4)のものと、欠損体(511.9)が6:4くらいの割合で見られた。目的のペプチドも合成できていたので、残りの樹脂を用いて合成を引き続き行い、C末端から81残基までのペプチドを合成した。ただし、C末端から69残基目のFmoc-Ser(tBu)、同70残基目のFmoc-Trp(Boc)および同71残基目のFmoc-Ser(tBu)を結合させる反応は、反応効率が低いことが予測されたので、デブロテクション溶液による反応を3回多く繰り返し、ペプチドに結合しているFmoc基を完全にははずした後、アミノ酸を結合させる反応時間を120分間に延ばして行なった。

【0094】上記の方法により、保護ペプチド樹脂(Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Trp(Boc)-Ser(tBu)-Met-Lys(Boc)-Val-Thr(tBu)-Val-Ala-Phe-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Phe-Gly-Pro-Phe-Ala-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Phe-His(Trt)-Leu-Gln(Trt)-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Leu-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Ile-Ala-Ser

特開平10-259198

26

(tBu)-Cys(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Gly-Leu-Val-His(Trt)-Val-Ala-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Asn(Trt)-Tyr(tBu)-Asp(OtBu)-Pro-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Glu(OtBu)-Gly-Gly-Asn(Trt)-Ile-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Asn(Trt)-Val-Glu(OtBu)-Wang樹脂)を合成した。

【0095】得られた保護ペプチド樹脂にデブロテクション溶液 7 ml を3分間、12分間と2回反応させてN末端Fmoc基を脱保護した；次に、7 ml のNMPにて6回洗浄後、ジクロロメタンにて3回洗浄し、さらにアルゴンガスを吹き付けることにより15分間乾燥させた。樹脂を取り出し、ペプチド13用クリベージ溶液を30 ml 加え、室温で2時間反応させることにより樹脂からのペプチドの切断およびアミノ酸側鎖保護基の除去を行い、ペプチド溶液を得た。

【0096】このペプチド溶液をフィルターを用いて滤過し、滤液を遠心管に回収した。アスピレーターにてこれを滤縮し、80 ml の冷エーテルを加え、ペプチドを沈殿させた。しばらく冷却後これを遠心して(3000 rpm、10分間)沈殿物を集め、再び冷エーテルを加えて分散させては回収する操作を3回繰り返してペプチドを洗浄した。得られたペプチドを乾燥させ、粗ペプチド640 mgを得た。

【0097】得られた粗ペプチドを0.1% TFAを含む20% アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった：
カラム：TMSカラム(ワイエムシーアック TMS SH-142-5、Φ20 mm×150 mm；(株)ワイエムシーアック)

移動相：33% アセトニトリル/0.1% TFA、5分間(アイソクラティック)の後、33-36% アセトニトリル/0.1% TFA、30分間(直線濃度勾配)

流速：5 ml/分

検出波長：230 nm。

【0098】19~22分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い、ペプチド(21 mg)を得た。得られたペプチドはまだ不純物を含んでいたため、さらに以下に記載する条件でHPLCを行なった。

カラム：ODSカラム(TSK-ゲル ODS-120 T、Φ21.5 mm×300 mm；東ソー(株)社製)

移動相：34-35% アセトニトリル/0.1% TFA、30分

流速：5 ml/分

検出波長：230 nm。

【0099】3.8~4.2分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行って、目的とするペプチド(9.3 mg)を得た。このペプチドについて、質量分析計を用い、ESI法にて分子量の確認を行なって分子量を確認した。さらに、このペプチド100 pmolについて

(15)

特開平10-259198

27

て、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、N末端から10残基分のアミノ酸配列が配列表の配列番号20のアミノ酸番号1から10に示されるアミノ酸配列と一致することが確認された。

【0100】〔実施例14〕スギ花粉抗原T細胞エピトープ活性

スギ花粉症患者由来のT細胞を用い、上記実施例で調製されたペプチド1ないし13がスギ花粉抗原T細胞エピトープ活性を有することを以下に記載する方法により確認した。皮膚テストにおいてスギ花粉アレルゲンに対し陽性を示し、かつ抗スギ花粉アレルゲンIgE反応に陽性を示す患者から20mlの末梢血を採取した。遠心分離後、パフィーコートを得て、さらにフィコール・パック比重遠心法により、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を採取した。このPBMCを培地 (5%の熱不活性化ヒトAB型血清を含む RPMI 1640) に懸濁した。

【0101】96穴の平底プレートに、1ウェルあたり5×10⁴個の細胞を分注し、各ウェル1μgの抗原 (ペプチド1ないし13、Cry j 1またはCry j 2のいずれか1種) を含む200μlの培地中で、37°C、5%炭酸ガス下で72時間培養した。また別に、ペプチドを含まない培養群を設けてこれを陰性対照とした。その後、1μCiのトリチウム化チミジンを加え、さらに16時間培養した。セルハーベスターを用いて各ウェルの細胞に含まれるDNAをガラス纖維フィルター上に集め、それぞれ液体シンチレーションカウンターで細胞に取り込まれたトリチウム化チミジン量を測定した。各群の取り込みチミジン量を陰性対照群の取り込み量で除した値 (刺激指数) が2以上であった群をT細胞エピトープ活性「陽性」とした。この結果を以下の表1に示す。

【0102】

【表1】

ペプチド	T細胞エピトープ活性
ペプチド1	陰性
ペプチド2	陰性
ペプチド3	陰性
ペプチド4	陰性
ペプチド5	陰性
ペプチド6	陰性
ペプチド7	陰性
ペプチド8	陰性
ペプチド9	陰性
ペプチド10	陰性
ペプチド11	陰性
ペプチド12	陰性
ペプチド13	陽性

【0103】特にペプチド13は、1名の患者由来の細胞においてCry j 1またはCry j 2を上回る活性を示した(表2)。

【0104】

【表2】

(15)

28

抗原	刺激指数
Cry j 1	7.8
Cry j 2	14.2
ペプチド13	20.5

【0105】〔実施例15〕ペプチドによる経口免疫寛容の誘導

1) ペプチド14 (Cry j 2のヒト主要T細胞エピトープペプチド) : Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr-Gln-Asn-Pro-Ala-Ser (配列表の配列番号7のアミノ酸番号4-14) は以下に記載する方法に従って調製した。まず実施例4と同様の操作で保護ペプチド樹脂 (Fmoc-Gly-Ile-Ile-Ala-Ala-Tyr(tBu)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Pro-Ala-Ser(tBu)-Wang樹脂) を合成し、クリベージ反応を行って、粗ペプチド7mgを得た。得られた粗ペプチドのうち11mgを0.1%のTFAを含む20%アセトニトリル水溶液に溶解後、HPLCに供した。HPLCの条件は以下の通りであった。

【0106】カラム: ODSカラム (TSK-gel 20 ODS-120T、Φ7.8mm×300mm; 東ソー(株)社製)
移動相: 21%アセトニトリル/0.1% TFA、20分 (アイソクリティック)
流速: 2ml/分
検出波長: 220nm。

9~11分に溶出された画分を分取し、濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするペプチド7mgを得た。このペプチド100pmolについて、実施例1と同様にしてアミノ酸配列分析を行なった結果、配列表の配列番号7のアミノ酸番号4-14に示されるアミノ酸配列が確認された。また、スギ花粉アレルゲンタンパク質Cry j 2は、平成8年特許公開第127591号公報において「スギ花粉アレルゲンA」として記載されている物質の製法に従って調製した。

【0107】C3H/HeNマウス (日本チャールズ・リバー(株)より購入) に対し、500μgのペプチド1をダルベッコPBS (-) (大日本製薬(株)) ; 以下「PBS」という) 200μlに溶解したものを2週間に4回経口投与した。対照群にはPBSのみを投与した。その後10μgのペプチド14をプロイントの完全アジュバントとともに両群のマウスの脇下皮下に皮下注射した。8日後に両群のマウスの脛骨部および膝窩部のリンパ節細胞を摘出し、2%マウス血清を含むRPMI 1640に懸濁してから、96穴プレートに1ウェル当たり約5×10⁴個の細胞を分注した。この各ウェルに抗原 (800nMのペプチド14または800nMのCry j 2) を含むかまたは含まない、細胞懸濁液と等量のRPMI 1640を加え、抗原の存在下または非存在下で3日間培養した (最終濃度: 抗原400nMまたは0nM; 1%マウス血清)。その

(15)

特開平10-259198

29

後1ウェル当たり0.5 μ Ciのトリチウム化チミジンを添加し、さらに16時間培養した。ペプチド投与群および対照群それぞれについて、抗原存在下および非存在下のリンパ節細胞のチミジンの取り込みを測定し、抗原存在下のチミジン取り込み量を非存在下のチミジン取り込み量で除した値を増殖活性として算出した。予めペプチド1を投与したマウス由来のリンパ節細胞の増殖活性は、対照群に比較して、ペプチド14に対しては39%、Cryj2に対しては30%低下していた。

【0108】2) C3H/HeNマウスに対し、500 μ gのペプチド2を200 μ lのPBSに溶解したものと2週間に4回経口投与した。対照群にはPBSのみを投与した。その後10 μ gのペプチド14をフロイントの完全アジュバントとともに両群のマウスの両フットパッドおよび尾根部に皮下注射した。8日後に両群のマウスの脛骨部および膝窩部のリンパ節細胞を摘出し、2%マウス血清を含む RPMI 1640に懸濁してから、96穴プレートに1ウェル当たり約5×10³個の細胞を分注した。この細胞を抗原(400nMのペプチド14または400nMのCryj2)存在下または非存在下で3日間培養した。その後1ウェル当たり0.5 μ Ciのトリチウム化チミジンを添加し、さらに16時間培養した。ペプチド投与群および対照群それぞれについて、抗原存在下および非存在下のリンパ節細胞のチミジンの取り込みを測定し、抗原存在下のチミジン取り込み量を非存在下のチミジン取り込み量で除した値を増殖活性として算出した。予めペプチド2を投与したマウス由来のリンパ節細胞の増殖活性は、対照群に比較して、ペプチド14に対しては15%、Cryj2に対しては28%低下していた。

【0109】3) C3H/HeNマウスに対し、500 μ gのペプチド3を200 μ lのPBSに溶解したものと2週間に4回経口投与した。対照群にはPBSのみを投与した。その後10 μ gのペプチド14をフロイントの完全アジュバントとともに両群のマウスの両フットパッドおよび尾根部に皮下注射した。8日後に両群のマウスの脛骨部および膝窩部のリンパ節細胞を摘出し、2%マウス血清を含む RPMI 1640に懸濁してから、96穴プレートに1ウェル当たり約5×10³個の細胞を分注した。この細胞を抗原(400nMのペプチド14または400nMのCryj2)の存在下または非存在下で3日間培養した。その後1ウェル当たり0.5 μ Ciのトリチウム化チミジンを添加し、さらに16時間培養した。ペプチド投与群および対照群それぞれについて、抗原存在下および非存在下のリンパ節細胞のチミジンの取り込みを測定し、抗原存在下のチミジン取り込み量を非存在下のチミジン取り込み量で除した値を増殖活性として算出した。予めペプチド3を投与したマウス由来のリンパ節細胞の増殖活性は、対照群に比較して、ペプチド14に対しては49%、Cryj2に対しては3

50

30

7%低下していた。

【0110】〔製剤例1〕 注射剤

安定剤として1% (w/v) シュークロースを含む生理食塩水に実施例1ないし13記載の方法により得たペプチドを最終濃度り、0.1、0.1または1mg/mlとなるよう溶解し、滅菌滅菌した後、滅菌バイアル瓶に2ml1ずつ分注し、凍結乾燥し、密栓する。本品は投与に先立ち、まずバイアル瓶内に注射用蒸留水等を1ml加え、次いで内容物を均一に溶解して使用する。安定性に優れ、有効成分として本発明によるペプチドを含んでなる本品は、スギ花粉症を治療・予防するための乾燥剤として有用である。

【0111】〔製剤例2〕 シロップ剤

実施例1ないし13記載の方法により得たペプチドのいずれかを0.1mg/mlに、トレハロース粉末(トレハロース: (株)林原生物化学研究所製)を50% (w/v) になるように、それぞれ蒸留水に溶解し、溶液を煮沸により滅菌過して13種類のシロップ状物を得る。これらのシロップ状物を2ml1ずつ滅菌バイアル瓶にそれぞれ別々に分注し、密栓する。安定性に優れ、摂取し易い本品は、スギ花粉症を治療・予防するためのシロップ剤として有用である。

【0112】〔急性毒性試験〕生後20日目のマウスに、製剤例1または2記載の方法により得た製剤を煮沸により経口または腹腔投与する。被験試料は、いずれの投与経路によっても、LD50が(ペプチドとして)200mg/kgマウス体重以上であり、このことは、本発明のペプチドが、ヒトを含む哺乳類に投与する抗スギ花粉症剤に安全に配合使用し得ることを示す。

【0113】

【発明の効果】本発明により、スギ花粉アレルゲンのT細胞エピトープからなるペプチドおよびそれらを有効成分として含んでなる抗スギ花粉症剤を提供することができた。そして、本発明のペプチドは、スギ花粉アレルゲンに特異的なイムノグロブリンE抗体に実質的に反応しないので、ヒトを含む哺乳類一般に投与すると、実質的にアナフィラキシーを引き起こすことなく、スギ花粉アレルゲンに特異的なT細胞を不活性化することができる。しかも、本発明のペプチドはその分子内に異なる複数のT細胞エピトープを含んでいるので、本発明のペプチドを有効成分として含んでなる抗スギ花粉症剤は、より広範なスギ花粉症患者に対して有効である。

【0114】

【配列表】

配列番号： 1

配列の長さ： 33

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

(17)

31

特開平10-259198

32

配列

Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Gly Ile Ile Ala Ala
 1 5 10 15
 Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys
 20 25 30

Leu

【0115】配列番号： 2

* トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 33

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

*

配列

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser
 Cys Leu Phe Ala Ser Lys Asn
 1 5
 10 15
 Phe His Leu Gln Lys Asn Gly Ile Ile
 Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala
 20 25
 30

Ser

【0116】配列番号： 3

20* トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 33

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

*

配列

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro
 Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly
 1 5
 10 15
 Lys Ile Ala Ser Cys Leu Phe Ala Ser
 Lys Asn Phe His Leu Gln Lys
 20 25
 30

Asn

【0117】配列番号： 4

★ トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 35

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

★

配列

Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Tyr Gly Ile Ile Ala
 1 5 10 15
 Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Tyr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala
 20 25 30

Ser Cys Leu

35

【0118】配列番号： 5

★ トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 35

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

★

配列

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Tyr Phe Ala Ser Lys
 1 5 10 15
 Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Tyr Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn
 20 25 30

(18)

特開平10-259198

33

34

Pro Ala Ser

35

【0119】配列番号： 6

配列の長さ： 35

配列の型： アミノ酸

配列

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Cln Asn Pro Ala Ser Tyr Lys Leu Thr Ser

1 5 10 15

Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Tyr Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu

20 25 30

Cln Lys Asn

35

【0120】配列番号： 7

配列の長さ： 17

配列の型： アミノ酸

配列

Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Cln Asn Pro Ala Ser Trp Lys

1 5 10 15

Asn

【0121】配列番号： 8

配列の長さ： 18

配列の型： アミノ酸

配列

Arg Ile Trp Leu Cln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly

1 5 10 15

Lys Gly

【0122】配列番号： 9

配列の長さ： 17

配列の型： アミノ酸

配列

Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Cln Lys Asn Thr Ile

1 5 10 15

Gly

【0123】配列番号： 10

配列の長さ： 17

配列の型： アミノ酸

配列

Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp

1 5 10 15

Asn

【0124】配列番号： 11

配列の長さ： 17

配列の型： アミノ酸

配列

Asp Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Cln Phe Gly Pro Asn

1 5 10 15

Cys

【0125】配列番号： 12

配列の長さ： 47

配列の型： アミノ酸

* トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ベブチド

*

* トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ベブチド

*

20★ トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ベブチド

★

★ トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ベブチド

★

◆ トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ベブチド

◆

* トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ベブチド

*

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ベブチド

50

(19)

35

特開平10-259198

36

配列

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Phe Ala Ser Lys
 1 5 10 15
 Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn
 20 25 30
 Gln Phe Gly Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn
 35 40 45

【0126】配列番号： 13

*トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 47

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

*10

配列

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Phe Ala Ser Lys
 1 5 10 15
 Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn
 20 25 30
 Gln Phe Gly Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp
 35 40 45

【0127】配列番号： 14

*トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 47

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

*20

配列

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Met Lys Val Thr
 1 5 10 15
 Val Ala Phe Asn Gln Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln
 20 25 30
 Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn
 35 40 45

【0128】配列番号： 15

★トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 47

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

★30

配列

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Met Lys Val Thr
 1 5 10 15
 Val Ala Phe Asn Gln Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln
 20 25 30
 Lys Asn Thr Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp
 35 40 45

【0129】配列番号： 16

★トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 21

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

★40

配列

Asn Pro Arg Ala Arg Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn Asn Asn Tyr
 1 5 10 15
 Asp Pro Trp Thr Ile
 20

【0130】配列番号： 17

◆トポロジー： 直鎖状

配列の長さ： 21

配列の種類： ベブチド

配列の型： アミノ酸

◆

配列

Val Ser Ser Gly Lys Tyr Glu Gly Asn Ile Tyr Thr Lys Lys Glu

(20)

特開平10-259198

37

38

1 5
Ala Phe Asn Val Glu

10 15

20

【0131】配列番号： 18

配列の長さ： 47

配列の型： アミノ酸

配列

Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Gly Ile Ile Ala

1 5 10 15

Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala

20 25 30

Ser Cys Leu Asn Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly

35 40 45

【0132】配列番号： 19

配列の長さ： 47

配列の型： アミノ酸

配列

Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Lys Leu Thr Ser Gly

1 5 10 15

Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro

20 25 30

Ala Ser Trp Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr

35 40 45

【0133】配列番号： 20

配列の長さ： 81

配列の型： アミノ酸

★

配列

Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro

Ala Ser Trp Ser Met Lys Val

1 5

10 15

Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro

Phe Ala Ser Lys Asn Phe His

20 25

30

Leu Gln Lys Asn Thr Lys Leu Thr Ser

Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu

35 40

45

Asn Tyr Gly Leu Val His Val Ala Asn

Asn Asn Tyr Asp Pro Ser Gly

50 55

60

Lys Tyr Glu Gly Gly Asn Ile Tyr Thr

Lys Lys Glu Ala Phe Asn Val

65 70

75 80

Glu

(21)

特開平10-259198

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁹ 識別記号

F I

(C 12 P 21/02
(C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
(C 12 R 1:125)
(C 12 P 21/02
(C 12 R 1:865)
(C 12 P 21/02
(C 12 R 1:91)

(72)発明者 川口 淳子
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内

(72)発明者 白石 明郎
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内

(72)発明者 芹海 伸記
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株
式会社内

(72)発明者 谷口 美文
岡山県岡山市平井5丁目3番30-5号